

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

B1

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11322601 A**

(43) Date of publication of application: **24.11.99**

(51) Int. Cl. **A61K 31/40**
A61K 31/40
A61K 31/40
A61K 31/40
A61K 31/40
A61K 31/40
A61K 38/00
C07D209/48

(21) Application number: **10169083**

(22) Date of filing: **12.05.98**

(71) Applicant: **FUJIMOTO BROTHERS:KK LEK TOVARNA FARMACEVTSKIH**

(72) Inventor: **YONEDA FUMIO**
MURAOKA SHIZUKO
MORIGUCHI MIHO
NORISADA NOBUYOSHI
OCHI CHIZURU
STALC ANTON
ANTON LAVRIK
URLEB UROS

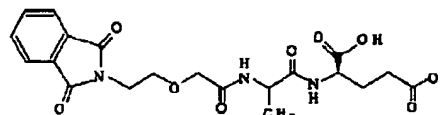
(54) **ANTI-INFLAMMATORY MEDICINAL COMPOSITION**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject composition useful for inflammatory colitis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Behcet's disease, etc., by containing [(phthalimidoethoxy)acetyl]-L-alanyl-D-glutamic acid as an active ingredient.

SOLUTION: This inflammatory medicinal composition is obtained by containing [(phthalimidoethoxy)acetyl]-L-alanyl-D-glutamic acid of the formula as an active ingredient. The objective composition has an anti-inflammatory activity due to a regulation of the production reaction of cytokines such as an acceleration of interleukin-10 production, a regulation of the production of interferon- γ , etc., and used for an inflammation accompanying with osteoarthritis, systemic erythematoides, inflammatory dermatitis, multiple organ failure after sepsis, AIDS, etc.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO



BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-322601

(43)公開日 平成11年(1999)11月24日

(51)IntCl.⁹

A 6 1 K 31/40

識別記号

A E D

A B A

A B E

A B G

A D A

F I

A 6 1 K 31/40

A E D

A B A

A B E

A B G

A D A

審査請求 未請求 請求項の数5 書面 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平10-169083

(22)出願日

平成10年(1998)5月12日

(71)出願人 397055067

株式会社フジモト・ブラザーズ
大阪府松原市西大塚1丁目3番40号

(71)出願人 598134640

レック トバルナ ファルマセプトスキー
インケミクニー イジエルコブ デイ.
スロヴェニア共和国、エスアイ-1526 リ
ュブリヤナ ペロブスコバ 57

(72)発明者 米田 文郎

大阪府松原市西大塚1丁目3番40号 藤本
製薬株式会社内

(74)代理人 弁理士 伊藤 武雄

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗炎症性薬剤組成物

(57)【要約】

【目的】炎症惹起性サイトカインの産生抑制活性を有し、またインターロイキン-10の産生を誘導す新規且つ有効な抗炎症性薬剤を提供することを目的とする

【構成】 N-〔2- (2-フタルイミドエトキシ) アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分として含む抗炎症性薬剤組成物。

【効果】 N-〔2- (2-フタルイミドエトキシ) アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸は、炎症惹起性サイトカインである腫瘍壊死因子及びインターフェロン-γの産生抑制活性を有し、またはこれらサイトカインの産生を抑制するインターロイキン-10の産生を誘導するという、サイトカイン産生反応の制御を誘因するため、炎症惹起性サイトカインが病態形成、発症病理に関与している炎症性大腸炎、関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、ベーチェット病、全身性エリテマトデス等を主体とする自己免疫性疾患、並びに痒疹・皮疹・狼疹・硬化を伴う炎症性皮膚疾患、敗血症後の多臓器不全、さらにはエイズ等の感染性疾患に伴う炎症の治療剤として有用である。

【特許請求の範囲】

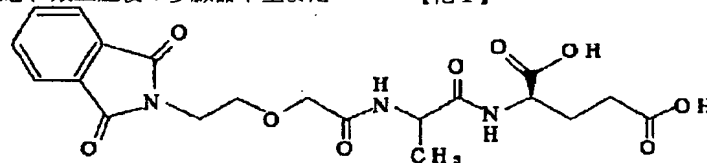
【請求項 1】 N-〔2-（2-フタルイミドエトキシ）アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分として含む抗炎症性薬剤組成物。

【請求項 2】 N-〔2-（2-フタルイミドエトキシ）アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分として含む、サイトカイン産生反応の制御による抗炎症作用を有する薬剤組成物。

【請求項 3】 サイトカイン産生反応の制御が、インターロイキン-10 の産生促進である請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 4】 サイトカイン産生反応の制御が腫瘍壊死因子の産生抑制および/またはインターフェロン- γ の産生抑制である請求項 2 記載の薬剤組成物。

【請求項 5】 炎症性大腸炎、関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、炎症性皮膚疾患、敗血症後の多臓器不全また



【0003】で示されるN-〔2-（2-フタルイミドエトキシ）アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分として含む、炎症性大腸炎、関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、ベーチェット病および全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患、並びに痒疹・皮疹・狼疹・硬化を伴う炎症性皮膚疾患、敗血症後の多臓器不全等の炎症性疾患、エイズ等の感染性疾患に伴う炎症に有効な抗炎症性薬剤組成物に関する。

【0004】

【従来の技術】多岐にわたる疾患の病因あるいは症状の亢進には炎症反応が関与しており、従来炎症性疾患としては分類されていなかった疾患、たとえば動脈硬化やアルツハイマー病なども、最近の分子生物学的研究により、その発症過程において炎症反応が重要な役割を担うことが明らかとなってきている。従来炎症伝達物質として、ヒスタミン、補体成分、血小板活性化因子、ブラジキニン、ロイコトリエン、プロスタグランジンE₂等のメディエーターが研究されてきたが、近年サイトカインやケモカインなどの蛋白液性因子の炎症反応惹起及び制御における重要性が明らかにされ、次々に新しい液性因子が発見されている。

【0005】これら液性因子が病因あるいは治癒に深く関わっている疾患のひとつに炎症性大腸炎（IBD）がある。欧米で発症率が高く、本邦でも最近発症頻度が上昇しつつある炎症性大腸炎は、大別して潰瘍性大腸炎とクローン病に分類される。潰瘍性大腸炎は、非特異的炎症が慢性持続的に、あるいは再燃緩解を繰り返して大腸に

はエイズのいずれかの疾患に伴う炎症に対して使用する請求項 1～4 記載の薬剤組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、N-〔2-（2-フタルイミドエトキシ）アセチル〕-L-アラニル-D-グルタミン酸を有効成分とする抗炎症性薬剤組成物に関する。さらに詳しく言えば、本発明は、サイトカイン産生反応の制御、より具体的には炎症惹起性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF- α ）並びにインターフェロン- γ （IFN- γ ）の産生を抑制、または、これら炎症惹起性サイトカインの産生を抑制する作用を有するインターロイキン-10（IL-10）の産生を促進するというサイトカイン産生反応の制御を誘因せしめる活性を有する下式、

【0002】

【化 1】

起こる疾患で、免疫異常、特にリンパ球の異常が挙げられている。クローン病は、若年成人に好発する消化管粘膜の異常により発症する肉芽腫性炎症性疾患で、主病変が小腸、大腸あるいはその両方に出現し、外科手術後の再発率が高く、内科的治療が主流とされるが、本症を長期的に寛解させる決定的な治療法が存在しない難治性疾患である。現在、これらの疾患治療剤として、スルファピリジン、5-アミノサリチル酸製剤（メサラジン）、サラゾスルファピリジン、副腎皮質ステロイドホルモン等が使用されており、特にサラゾスルファピリジンは、スルファピリジンと5-アミノサリチル酸がアゾ結合した化合物で、大腸内で腸内細菌によりアゾ結合が分解されて生じる5-アミノサリチル酸が両方のIBDに有効性を発揮する。しかしながら副作用として、薬剤過敏症、吐き気、頭痛、男性不妊症が報告されており、5-アミノサリチル酸製剤の場合は、下痢などの副作用が問題となり、長期的に寛解させる決定的治療薬はまだ無い。

【0006】慢性炎症性疾患の代表ともいえる関節リウマチ、変形性関節症の病因は未だ解明されていないが、関節周辺組織で、細菌やウイルス等の感染を発端とする自己免疫反応が持続的に惹起されることが原因とされている。開関節リウマチの主たる病変は関節に発症し、発症初期には、滑膜内小血管が増生し、それに伴い、滑膜表面細胞の増殖促進、多層化が起こってパンヌス形成の経過をたどり、好中球、滑膜表面細胞や活性化されたマクロファージからコラゲナーゼが分泌され、組織コラーゲ

ンの破壊を生じ、その結果として骨吸収亢進、軟骨破壊をもたらす。従来、関節リウマチ、変形性関節症の治療方法として初期段階では、アスピリン、インドメタシン、プロピオン酸系製剤であるイブプロフェン、オキシカム系製剤としてピロキシカムなどの非ステロイド性の抗炎症鎮痛剤（NSAIDs）による治療を施し、十分な効果が得られない場合は、疾患修飾性抗リウマチ薬（DMARD）である金製剤、スルファサラジン、D-ペニシラミン、メトトレキサート、あるいは、アザチオプリン、ミゾリピンが使用される。特に炎症症状が亢進した状態では、副腎皮質ステロイドホルモンの併用投与を行うことが治療の主流となっている。そして、これら抗リウマチ薬の薬効のメカニズムは、プロスタグランジンE₂産生抑制、NOや活性酸素、ロイコトリエン産生抑制、シクロオキシゲナーゼ阻害などの直接的抗炎症作用に基づくものであるが、NSAIDsもDMARDもその投与により胃腸障害、腎障害、肝障害、肺障害の副作用が出現することが多く、従って本疾患の治療では、病態に最も適した薬剤の選択はもとより、副作用の発現を如何に軽減するかが常に問題となる。

【0007】関節リウマチや変形性関節症の病変部位では、腫瘍壊死因子（TNF- α ）、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-6（IL-6）、インターフェロン- γ （IFN- γ ）等のサイトカイン産生が亢進していることが明らかにされ、特に関節滑膜では、種々の炎症メディエーターの連鎖的生成により、激しい炎症が引き起こされることが明らかとなっている。また、潰瘍性大腸炎とクローン病の病因としての抗原あるいは活性化物質は、十分には解明されていないが、細菌や化学物質、自己免疫異常などが挙げられ、最近の研究から、病因として、CD4Tリンパ球の異常活性化、TNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインの過剰産生、あるいはTNF- α 産生抑制性サイトカインである、インターロイキン-10（IL-10）の欠損ないしは産生不全によるTNF- α の過剰産生が、深く関与していることが明らかにされた（Nielsen, O. H., et al., Dig. Dis. Sci., 41, 1786, 1996）。このように、関節リウマチにおいても、炎症性大腸炎においても、病因として炎症惹起性サイトカイン、特にTNF- α を代表とする炎症性サイトカインの関与が大きいことから、炎症性疾患の治療剤開発目的の1つとして、病態におけるサイトカイン産生制御活性を目指した薬剤の開発が盛んになってきた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】この観点に立ち、すでに欧米では例えば、TNF- α 抗体や、可溶性TNF- α 受容体蛋白、あるいはIL-10のTNF- α 産生制御活性に基づき、IL-10の遺伝子組み替え（リコンビナント）蛋白製剤について臨床試験が行われ、それぞ

れに有効性が示されたが、これらの産生コスト等の大量生産上の問題や非常に短い生体内半減期の問題、およびこれらの蛋白に対する生体の免疫反応の結果としての抗体の生成が指摘され、まだいずれも実用化されるには至っていない。また、サイトカインは極微量で強い生物活性を示すものであり、そのものの投与では制御が難しく、更には、蛋白分子の反復投与は、重篤な副作用を誘発することも考えられる。

【0009】

10 【課題を解決するための手段】我々は、従来用いられている有機合成製剤の副作用の問題、あるいは各国の研究者が開発中の蛋白製剤の問題点を解決するためには、生体投与後、炎症惹起性サイトカインと拮抗あるいは産生抑制性活性を発揮する薬剤の開発が望ましく、リコンビナントIL-10そのものを投与するよりも、生体内でIL-10産生を誘導する薬剤の方が、最適投与経路、投与時期、投与量を決定することにより、より効果的かつ適切に炎症疾患部位においてIL-10の効果を発現せしめ、従来の問題点を解決し得ると考えた。そして、

20 IL-10産生誘導活性を有する薬剤の開発を開始し鋭意研究した結果、本発明で述べるN-[2-(2-フルイミドエトキシ)アセチル]-L-アラニル-D-グルタミン酸が、以下に述べる生物学的特性から本目的に優れた薬剤となることを見出し本発明を完成させた。

【0010】IL-10は免疫担当細胞であるTリンパ球のTh1とTh2からなる細胞群のうち、Th1細胞由来サイトカインであるIFN- γ 、リンボトキシン（TNF- β ）の産生抑制因子として、おもにTh2細胞から産生されるが、マクロファージやケラチノサイトからも産生されることが知られている。またIL-10はマクロファージのTNF- α 産生を強力に抑制する生物活性をも有している。また反面、IL-10はTh1細胞やマクロファージに対しては抑制的に作用するが、CD8+細胞障害性T細胞、抗体産生細胞、肥満細胞に対しては促進的に作用する。このIL-10の主たる生物活性は、IL-10遺伝子欠損マウスで、自然発生的に炎症性大腸疾患が発症すること[R. Kuhn, et al., Cell, 75, 263 (1993)]、ヒトの潰瘍性大腸炎やクローン病では血清中のIL-10が有意に低下していること[石田博, 臨床免疫, 27 (Suppl.), 16, 97 (1995)]からも、腸管系における免疫機構の制御作用が主であることがわかる。また、これらの炎症性大腸疾患では、その発症の機序にTNF- α やIL-1、IFN- γ が関与していることが多くの研究者らにより報告されている。一方、これらのサイトカインは痛みの原因や穿孔性腹膜炎や、グラム陰性菌による敗血症からの予後不良の原因ともなるが、IL-10はマクロファージによるTNF- α やIL-1産生の抑制作用を有し、またTh1細胞によるIFN- γ 産生を抑制することが既に確認された事実とし

てあり、よってIL-10産生を促進する本薬剤は、これら主としてマクロファージやTh1細胞から産生される炎症惹起性サイトカインに起因する疾患、あるいはこれらのサイトカインにより増悪経過をたどる疾患に効果的に使用できる。

【0011】本薬剤のN-[2-(2-フタルイミドエトキシ)アセチル]-L-アラニル-D-グルタミン酸は、古くからフロイント完全アジュバントに含有されることで知られる結核菌やBCGなどの抗酸菌の細胞壁中に存在するアジュバント作用物質であるムラミルジペプチド誘導体を合成する目的でデザインされた化合物であるが、ムラミル基の代わりにフタルイミドエトキシアセチル基が、L-アラニル-D-グルタミン酸のジペプチドに結合されている化合物で、米国特許5,514,654号に一連のN-アシルジペプチド誘導体とともに開示された公知の化合物である。米国特許5,514,654号は、免疫調節活性及び抗腫瘍活性を有するN-アシルジペプチド誘導体の作成を目的としたものであり、その化合物の免疫調節的特性として、アジュバント作用、すなわち免疫調節作用として本薬剤とは異なるN-

(7-オキソオクタノイル)-L-アラニル-D-イソグルタミンによるマイトジェンによるリンパ球の活性化増強、マクロファージ活性化促進、*in vivo*腫瘍増大阻止という免疫反応促進活性を記載している。しかし、本薬剤のIL-10産生誘導活性、TNF- α および/またはINF- γ 産生抑制活性等の生物活性の特性発見と、その活性に基づく抗炎症作用については前期文献の存在にかかわらず新規である。

【0012】本発明の有効成分であるN-[2-(2-

フタルイミドエトキシ)アセチル]-L-アラニル-D-

グルタミン酸は、下式、

【0013】

【化1】

【0014】で示される化合物であり、例えば次の方法により容易に製造することができる。すなわち、L-アラニル-D-グルタミン酸ジベンジルエステルの塩酸塩と2-(2-フタルイミドエトキシ)酢酸をジメチルホルムアミドのような非プロトン性溶媒に溶解し、0℃に冷却し、ジフェニルホスホリルアジドとトリエチルアミンを添加することによって縮合させ、得られたN-[2-

(2-フタルイミドエトキシ)アセチル]-L-アラニル-D-グルタミン酸ジベンジルエステルを氷酢酸中水素充填下、パラジウム/炭素により接触還元して収率よく得ることができる。

【0015】

【発明の効果】次に、本発明者らの研究結果より、本薬剤が病態モデル動物に投与されると、免疫増強作用を生じるメカニズムとは異なり、IL-10産生を誘導し、ひいてはTNF- α 及びINF- γ の産生抑制効果を生じること、また毒性及び変異原性が無いことが明らかと

なった。

【0016】本事実に基づき、本発明では異なる疾患モデル動物に本薬剤を投与し、病態発症予防、改善、病態進行の阻止あるいは遅延に対する効果を観察するのみならず、薬効発現のメカニズムの解析も行い、本薬剤の製剤が抗炎症剤として有効であり、炎症性大腸炎、関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、パーチェット病および全身性エリテマトーデス等の自己免疫性疾患、並びに痒疹・皮疹・狼疹・硬化を伴う炎症性皮膚疾患、敗血症後の多臓器不全等の炎症性疾患、エイズ等の感染性疾患に伴う病態の治療剤として応用することの妥当性が示された。例えば、化学療法剤治療下のマウスに、本薬剤を皮下投与すると、IL-10産生能の増強及びINF- γ 産生能の抑制が誘導され、IL-10産生能力を有する細胞集団の増殖を促進することを示していると言える。潰瘍性大腸炎モデル動物では、顕著なIL-10産生能の低下が起こることが示され、本薬剤の皮下あるいは直腸内投与は、症状増悪の遅延あるいは症状の緩和を明らかにもたらし、また関節リウマチモデル動物に投与した場合には、発症遅延及び四肢関節の炎症症状の緩和が観察された。これらの実験結果は、本薬剤が大腸炎症病態におけるIL-10産生能低下を是正することにより、TNF- α 産生を抑制するというメカニズムで、病態の進行を遅延させることを示すものである。また本薬剤の安全性は、亜急性毒性試験並びに変異原性試験により確認された。従って本薬剤は、錠剤（大腸溶解性製剤を含む）、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤などの経口投与、あるいは注射剤や坐剤及び注腸剤による非経口投与の医薬用製剤として用いることができ、適当な医薬用の賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定化剤、矯味矯臭剤等を用いて、通常の如何なる方法によっても製剤化可能である。処方当たっては、本薬剤単独または薬学的に許容できる範囲内で塩の形、あるいは他の医薬品製剤との配合製剤としてもよい。その使用量は症状、年齢等により異なるが、注射剤の場合は1日100 μ g～100mg、その他の投与形態の場合は1日10～1000mgを、好ましくは通常成人に対して、20～100mgを1日1回または数回に分けて投与することができる。以下実施例を示して本発明を詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を限定するものではない。

【0017】

【実施例1】本薬剤皮下投与によるIL-10産生誘導並びにINF-T産生抑制
8～12週令の(C57BL/6XDBA/2)F1雌マウスに、サイクロフォスファミド(200mg/kg)を2日間腹腔内投与し、その後3日目から、生理食塩液に溶解した本薬剤1 μ g、5 μ gあるいはマンニトールとともに溶解した50 μ gを1日1回4日間皮下注射により投与した。非治療対照群マウスには生理食塩液

のみを、あるいはマンニトール溶液のみを皮下注射した。最終投与日の翌日各マウスより脾臓を採取し、それを二分し、片方からは全RNAを抽出、他方は単細胞にしてコンカナバリンA (Con A) あるいはエンドトキシン (LPS) とともに24~48時間5%炭酸ガス培養器中で培養し、培養上清中のサイトカイン濃度を酵素免疫反応法 (ELISA) で測定した。抽出したRNAは、逆転写反応ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) およびNorthern Blot法試験に供した。種々のサイトカインのmRNA発現レベルを比較するために、RT-PCRの場合は寒天ゲル電気泳動後のバンドを、Northern Blotの場合は、ナイロン膜に転写され、プローブで検出されたバンドの濃さを、自動デンストメーターにより測定した。RT-PCR試験結果を図1 (生理食塩液、本薬剤1 μ g、5 μ g) および図2 (マンニトール液、本薬剤50 μ g) に示すように、本薬剤を各用量投与されたマウスの脾臓の全RNA中には、対照群に比較してIL-10のmRNAがより高く発現していることが明らかとなった。一方、IFN- γ のmRNAのレベルは、本薬剤投与群の方が対照群より低く、特に50 μ g投与群でその低下はより顕著であった。形質転換性成長因子 (TGF- β) のmRNAレベルも、本薬剤投与群でやや低下傾向を示した。本薬剤によるIL-10のmRNA産生促進効果をさらに確認するために、これらのRNAサンプルについて、IL-10プローブを用いたNorthern Blotを行い、その結果を図3に示す。本薬剤5及び50 μ g投与群では、それぞれの対照群に比較し、明らかに高いIL-10のmRNAの産生誘導が生じたことが確認された。

【0018】

【図1】

【0019】

【図2】

【0020】

【図3】

【0021】次に本薬剤投与が、IL-10蛋白の産生促進にも効果を有することを示すために、24時間および48時間Con Aで刺激された脾臓細胞の培養上清中に分泌されたIL-10蛋白量をELISAにより測定した。図4 (24時間) と図5 (48時間) にその結果を示す。本薬剤1 μ g投与はIL-10産生促進効果を全く生じなかったが、5 μ gおよび50 μ g投与は対照群に比較し、脾細胞におけるIL-10蛋白産生を強く誘導することが明らかとなった。これらの結果は、本薬剤がIL-10産生能力を有する細胞集団の増殖を促進することを示している。

【0022】

【図4】

【0023】

【図5】

【0024】

【実施例2】潰瘍性大腸炎疾患モデル動物における、本薬剤によるIL-10産生増強及びその治療効果
デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の3~5%水溶液をマウスやラットに連続摂取させると、急性の大腸炎症および壊爛・潰瘍が発症することが知られている (Okayasu, I., et al., Gastroenterology, 98, 694, 1990)。8~12週令、体重19.5~21.5g Balb/c CrSLc雌マウスに、5%DSS (分子量5,000) 水溶液を飲水として与えると共に、生理食塩液に溶解した本薬剤5 μ gを、2ないし3日毎に2週間皮下注射した。体重測定と便潜血により病状の進行を観察した。2週間後に脾臓を採取し、単細胞にしてCon AあるいはLPSとともに24~48時間5%炭酸ガス培養器中で培養し、培養上清中のサイトカイン濃度をELISAにより測定した。8日目までに、本薬剤投与を受けなかった対照群のマウスすべてに、体重減少と、スコア2以上の便潜血が認められ、平均便潜血スコアは3.5であった。14日目には10匹中9匹が最高の便潜血スコア4を、残り1匹はスコア3を示す重篤な症状を呈した (図6)。スコア2以上の便潜血を示したマウスの割合も、7日目で90%、11日目では100%であった (図7)。それに対して、本薬剤投与マウスでは対照群に比較し症状の進行が遅延され、平均便潜血スコア及びスコア2以上の便潜血マウス出現割合、最高便潜血スコアを示すマウス数ともに、対照群に比し明らかに低かった。

【0025】

【図6】

【0026】

【図7】

【0027】DSSの摂取による大腸炎の発症は、脾細胞よりのIL-10産生を顕著に低下させることが明らかとなった。DSSを7日間、10日間、あるいは14日間摂取したマウスより脾臓を摘出し、単細胞懸濁液を調製し、Con AあるいはLPS刺激下に培養した。図8に示すように、DSS摂取マウスの脾細胞培養上清中のIL-10サイトカイン濃度は、非摂取マウスのそれと比較し著しく低かった。IL-6の濃度は、DSS摂取マウスの脾細胞培養上清の方が、Con A刺激では有意に低く、LPS刺激では非摂取マウス群とほぼ同一レベルであった。このDSS摂取によるIL-10産生能の低下は本薬剤投与により是正されることが、次に述べる実験で明らかとなった。すなわち、図9に示す実験結果からも明らかのように、DSS摂取生理食塩液投与マウス群の脾細胞のIL-10産生能が著しく低下しているのに比し、DSS摂取本薬剤投与マウス群の脾細胞のIL-10産生能は、正常マウス群の産生能レベル

に回復していた。また、これらのマウスより採取した腹腔マクロファージをLPS存在下に2時間培養し、その培養上清中のTNF- α をELISAにより測定したところ、本薬剤投与群マウス由来の培養上清中のTNF- α は、DSS摂取生理食塩液投与群のそれに比較し有意に低かった(図10)。

【0028】

【図8】

【0029】

【図9】

【0030】

【図10】

【0031】

【実施例3】クローン病モデル動物における本薬剤の治療効果

アルコールに溶解したトリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)をラット直腸内に注入すると、10日以内に大腸に肉芽腫性炎症が惹起され、クローン病の動物モデルとして汎用されている(norris, G. P., Gastroenterology, 96, 795, 1989)。本発明者らは、このクローン病モデル動物において、本薬剤が有効であるか否かを検討するため、Sprague-DawleyラットにTNBS 30mgを腸注し、翌日より1%カルボキシメチルセルロース(CMC)に懸濁した本薬剤を、25mg/kg/日の用量で8日間直腸内投与した。9日目に大腸を肛門より10cmの部位まで採取し、腸内内容物を洗浄除去後、その湿重量測定、大腸肥大、潰瘍形成の有無、そのサイズ、病理所見などを観察した。図11(大腸重量)、図12(Morrisスコア)、図13(腸管内壁の変化—黒変部位の長さ、腸管展開時の最大幅)に示すように、TNBSによる腸内感作は、正常群ラット腸に比較して、典型的な潰瘍性炎症症状を誘発し、腸重量の顕著な増加、腸粘膜肥厚を伴う潰瘍を惹起した。本薬剤のTNBS腸炎惹起ラットへの直腸内投与は、腸重量増加抑制、腸管肥大抑制、潰瘍形成及び壊死の抑制など、観察所見の全てで大腸肉芽腫性炎症を抑制する効果を示した。

【0032】

【図11】

【0033】

【図12】

【0034】

【図13】

【0035】

【実施例4】関節リウマチ(RA)、変形性関節症における本薬剤の有効性

関節リウマチの病態モデル作成法の1つとして、特定の遺伝的背景を有する純系マウスを、フロイント完全ア

法が用いられている(Woolley, P. H., et al., J. Exp., Med., 154, 688, 1981)。本発明者らも、この病態モデルを用いた。すなわち、8週令のDBA/1雄マウスの尾根部位に、フロイント完全アジュバントに懸濁したタイプIIウシコラーゲン150 μ gを皮内投与し、3週間後に再感作すると、再感作後、5~6日目より四肢の一部で関節の発赤・腫脹が現れ、徐々に四肢の関節へと広がり、3~4週目頃より指関節の変形が発症してきた。各病変をスコア化し、1匹のマウスにおけるスコアの集計で、そのマウスの病状を記録した。第1回目の実験では、生理食塩液に溶解した5 μ gの本薬剤を、初期感作の翌日より2~3日毎に、全観察期間皮下投与した。図14に示すように、本薬剤を投与したマウス群の平均発症スコアは、常に対照マウス群の平均スコアを下回り、また体重は対照群よりも高い増加率を示した(図15)。第2回目の実験では、0.2mg、5mg/kgの2用量を毎日皮下投与した。陽性対照既知医薬品として、4-アセチルアミノフェニール酢酸(アクタリット)30mg/kgを経口投与した。図16及び図17に示されるように、本薬剤5mg/kgを投与されたマウス群は、対照群に比較して個体別関節炎スコア及び全マウス四肢における、のべ四肢関節炎発症率共に低く、発症の遅延及び症状の軽減化作用が観察された。アクタリットの経口投与は、初期段階の発症の遅延と関節炎スコアを減少させたが、その作用は本薬剤5mg/kg皮下投与の作用よりも弱く、中期及び後期では対照群に比較して症状を軽減化させる作用は示さなかった。これらの結果は、本薬剤が関節リウマチの治療薬としてアクタリットよりも高い有効性を発揮し得る可能性を示すものである。

【0036】

【図14】

【0037】

【図15】

【0038】

【図16】

【0039】

【図17】

【0040】

40 【実施例5】本薬剤の安全性

本薬剤の安全性を、亜急性毒性試験と変異原性試験を行って確認した。亜急性毒性試験は、本薬剤をオイル(arachis oil)に懸濁し、2.5、25および250mg/kg/日の3用量を91日間雄ラット(Han-Wistar)に腹腔内投与して行い、体重測定、摂餌量、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査を行った。屠殺後、解剖学および病理学的検査も行い、その結果を表1に示す。いずれの用量でも、ラットの死亡例は無く、これらのラットの臓器の病理学的検査の結果より、無毒性用量は2.5mg/kg/日より2

5mg/kg/日の範囲と決定した。また第二回目の亜急性毒性試験を、25mg/kg/日の90日間投与、それに続く45日間観察期間を置いて実施した。この試験においてもラットの死亡例は無く、血液検査および血液生化学的検査において、投与による本質的変化は認められなかった。また個々のラットの剖検、および各臓器

切片の病理組織学的検査においても、対照群のラットの各試験結果と比較して、投与に関連する臓器変化は観察されなかった。

【0041】

【表1】

ラット91日間腹腔内投与による亜急性毒性試験結果のまとめ

動物種、系統	ラット、Han.-Wistar、5週齢、雄、体重約75g			
投与方法、期間	腹腔内投与、91日間			
投与量 (mg/kg/日)	対照	2.5	25	250
動物数	10	10	10	10
死亡数	0	0	0	0
体重 (91日目)	-	差なし	差なし	差なし
摂餌量 (開始日比較)	増加	差なし	差なし	差なし
血液学的検査	-	差なし	差なし	差なし
血液生化学的検査	-	差なし*	差なし*	差なし*
尿検査	-	差なし	差なし	差なし
臓器重量	-	差なし	脾、副腎重量減少	脾、副腎重量減少
剖検	-	差なし	差なし	変化あり
病理組織学的検査	-	差なし	差なし	変化あり

表1 脚注

: Cl 若干上昇、: Cl、血糖値およびクレアチンの若干上昇

【0042】また変異原性試験は、本薬剤をジメチルスルフォキシド (DMSO) に試験直前に溶解し、ネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*) TA98、TA97A、TA100、および TA1935 とサッカロマイセス・セレビジア (*Saccharomyces cerevisiae*) D7 に対して、1プレート当たり5~5000μgの濃度で菌代謝活性下状態及び不活性下状態で作用させ、生じたりバータントのコロニー数を検出することにより試験し

た。変異原性陽性対照薬物としてサルモネラ・ティフィムリウムを被験菌とした場合は、N-メチル-N'-ニトロソグアニジン (MNNG) を、サッカロマイセス・セレビジア D7 に対しては、N-メチルニトロソウレア (HNU) およびシクロフォスファミドを用いた。いずれの菌種に対しても変異原性は認められなかった (表2)。

【0043】

【表2】

本薬剤の変異原性試験結果のまとめ

ネズミチフス菌	代謝活性化	MNNG変異Index	本薬剤変異Index 5000 $\mu\text{g}/\text{plate}$
TA98	-	4.83, 3.24	0.84, 1.21
	+	7.20, 6.90	1.00, 1.33
TA97A	-	5.55, 6.03	1.57, 1.14
	+	8.73, 2.39	1.03, 1.06
TA100	-	13.57, 10.01	0.93, 0.82
	+	4.85, 7.59	1.14, 0.92
TA1535	-	58.26, 38.33	1.09, 1.28
	+	4.01, 4.28	0.84, 1.40

サッカロマイセス・セレクタ	代謝活性化	陽性対照薬物	本薬剤 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
D7		convertant頻度	convertant 頻度
	-	1.5×10^{-5}	3.1×10^{-5}
	+	1.3×10^{-4}	1.1×10^{-5}
		revertant 頻度	revertant 頻度
	-	7.0×10^{-4}	4.5×10^{-4}
	+	2.6×10^{-5}	1.8×10^{-4}

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における本薬剤投与時のRT-PCR試験によるサイトカインmRNAのレベルを示すグラフである。

【図2】実施例1における本薬剤投与時のRT-PCR試験によるサイトカインmRNAのレベルを示すグラフである。

【図3】実施例1におけるNorthern Blot試験によるIL-10 mRNAのレベルを示すグラフである。

【図4】実施例1における脾細胞24時間培養上清中のIL-10濃度を示すグラフである。

【図5】実施例1における脾細胞48時間培養上清中のIL-10濃度を示すグラフである。

【図6】実施例2におけるDSS誘発大腸炎マウスの平均潜血スコアを示すグラフである。

【図7】実施例2におけるDSS誘発大腸炎マウスの便潜血スコア2以上のマウスの割合を示すグラフである。

【図8】実施例2における無処置及びDSS摂取マウス脾細胞培養上清中のサイトカイン濃度を示すグラフである。

【図9】実施例2における無処置、DSS摂取生理食塩

液投与及びDSS摂取本薬剤投与マウス脾細胞培養上清中のIL-10濃度を示すグラフである。

【図10】実施例2における無処置、DSS摂取生理食塩液投与及びDSS摂取本薬剤投与マウス腹腔マクロファージ培養上清中のTNF- α 濃度を示すグラフである。

【図11】実施例3におけるTNBS誘発大腸炎ラットの大腸重量を示すグラフである。

【図12】実施例3におけるTNBS誘発大腸炎ラットの大腸Morrisスコアを示すグラフである。

【図13】実施例3におけるTNBS誘発大腸炎ラットの大腸黒変壊死部分の長さ、病変腸管最大幅を示すグラフである。

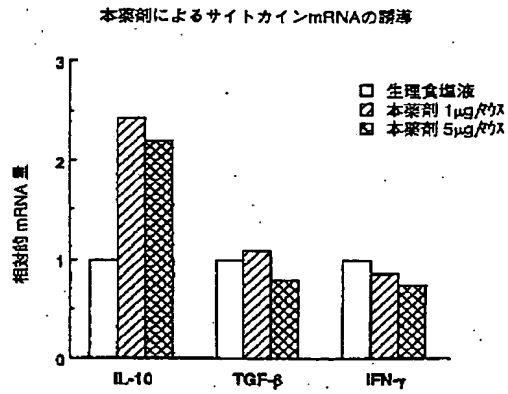
【図14】実施例4における第1回関節炎実験の個体別平均関節炎スコアを示すグラフである。

【図15】実施例4における第1回関節炎実験の平均体重の推移を示すグラフである。

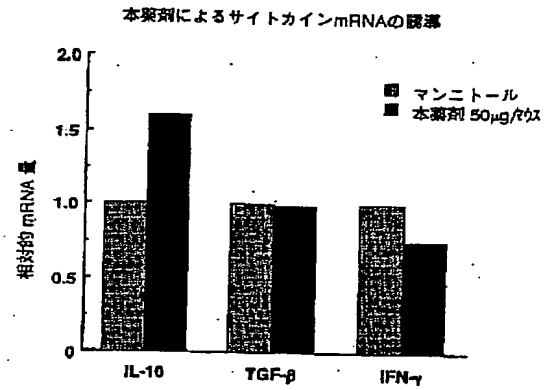
【図16】実施例4における第2回関節炎実験の個体別平均関節炎スコアを示すグラフである。

【図17】実施例4における第2回関節炎実験の、のべ四肢関節炎発症率を示すグラフである。

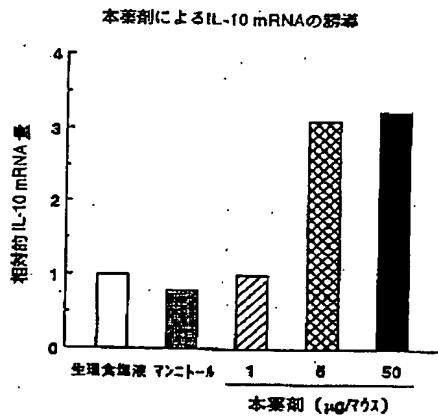
【図1】



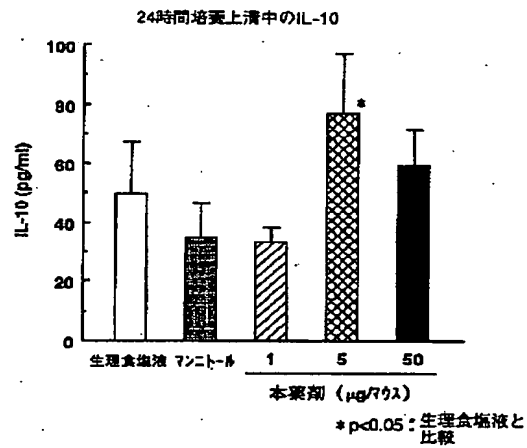
【図2】



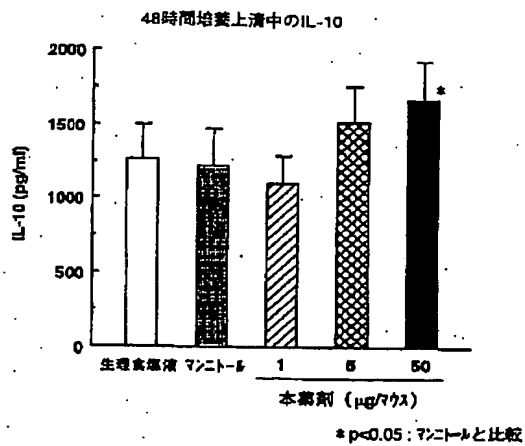
【図3】



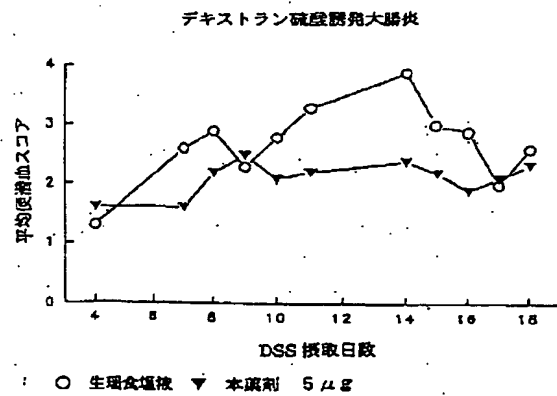
【図4】



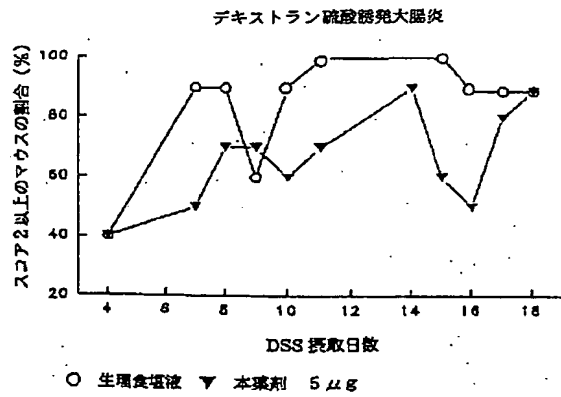
【図5】



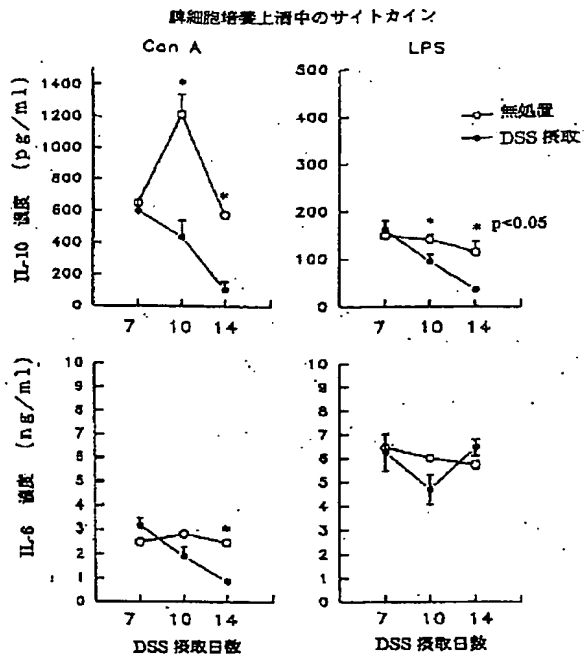
【図6】



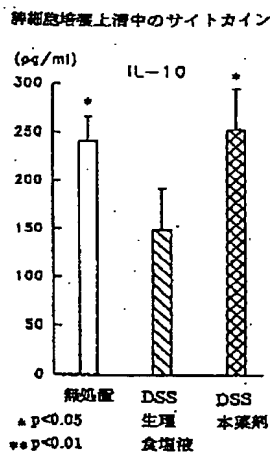
【図7】



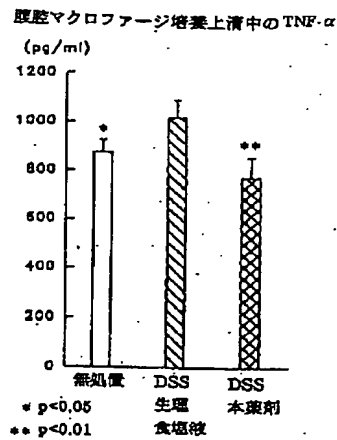
【図8】



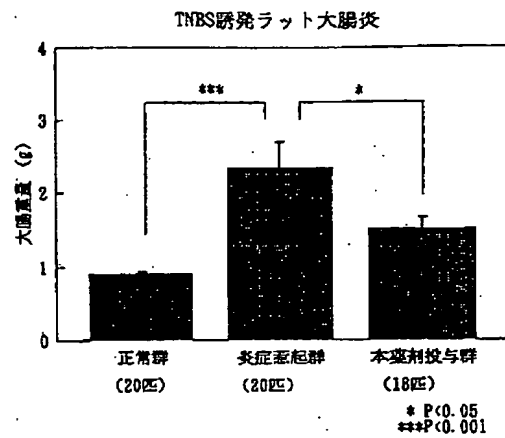
【図9】



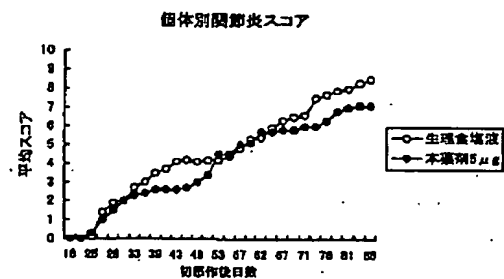
【図10】



【図11】

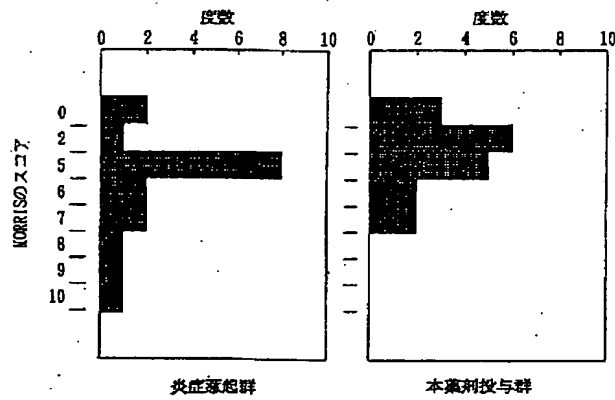


【図14】



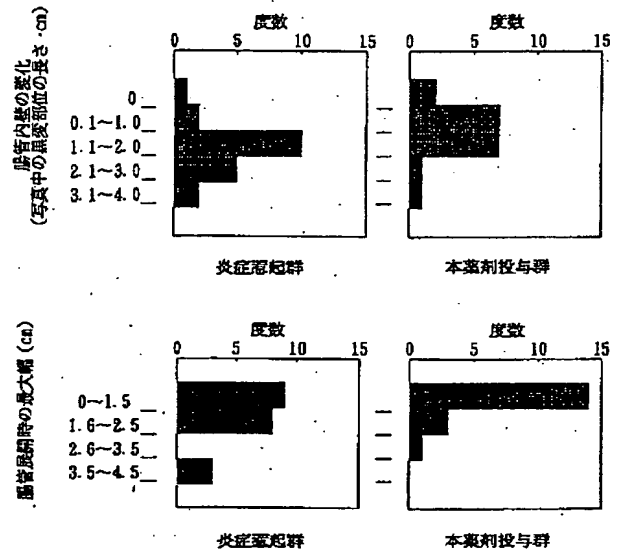
【図12】

TNBS誘発ラット大腸炎



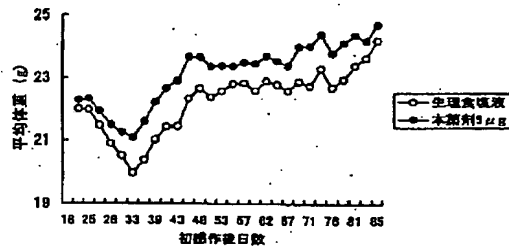
【図13】

TNBS誘発ラット大腸炎



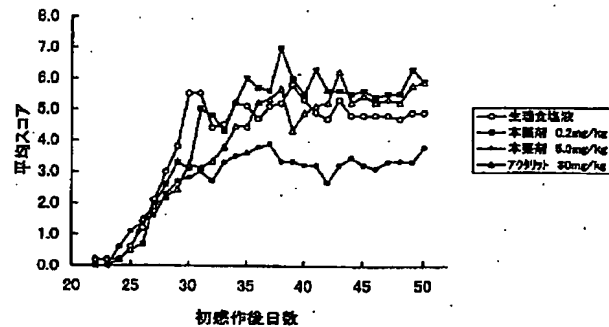
【図15】

体重の推移



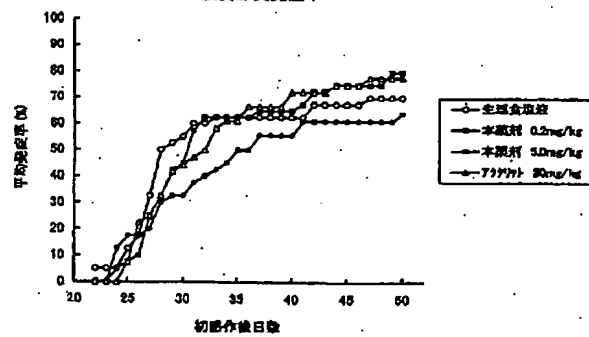
【図16】

個体別関節炎スコア



【図17】

のべ四肢関節炎発症率



【手続補正書】

【提出日】平成10年7月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

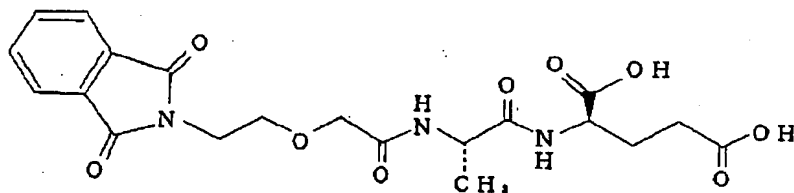
【補正対象項目名】0002

【補正方法】変更

【補正内容】

【0002】

【化1】



【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

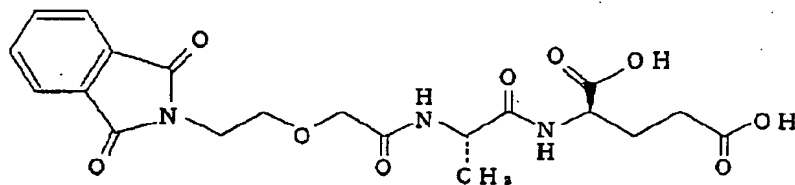
【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】

【化1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

A61K 31/40

38/00

C07D 209/48

識別記号

ADY

ACJ

FI

A61K 31/40

37/02

C07D 209/48

ADY

ACJ

Z

(72)発明者 村岡 静子

大阪府松原市西大塚1丁目3番40号 藤本
製薬株式会社内

(72)発明者 森口 美保

大阪府松原市西大塚1丁目3番40号 藤本
製薬株式会社内

(72)発明者 則貞 伸嘉

大阪府松原市西大塚1丁目3番40号 藤本
製薬株式会社内

(72)発明者 越智 千鶴

大阪府松原市西大塚1丁目3番40号 藤本
製薬株式会社内

(72)発明者 アントン スタルク

スロヴェニア共和国、リュブリャナ
61000、ラシスカ 5

(72)発明者 アントン・ラブリク

スロヴェニア共和国、ピヤワ ゴリカ
1291、ピヤワ ゴリカ 206

(72)発明者 ユーロス・ユルレブ

スロヴェニア共和国、リュブリャナ
1000、ヘルベルシュタイノワ 18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.